تعیین ترکیبات شیمیایی و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و باکتری‌کشی اسانس نعناع دشتی (*Mentha spicata*) بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*

کتایون مخیری[1]، هادی کوهساری[2*]، سیده زهرا سیدالنگی[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

۳. گروه شیمی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

***نویسنده مسئول**: *hadikoohsari@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸

چکیده

نعناع دشتی یک گیاه دارویی پرمصرف بوده که به عنوان یک گیاه ادویه‌ای رایج در صنایع غذایی نیز کاربرد دارد. این مطالعه به منظور بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاه نعناع دشتی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* انجام شد. جهت استخراج اسانس برگ‌های گیاه از دستگاه کلونجر استفاده شد. شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی صورت پذیرفت و سپس کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی اسانس مذکور با استفاده از روش رقت در میکروپلیت ۹۶ چاهکی (میکرودایلوشن) انجام شد. در مجموع ۳۳ ترکیب شناسایی شدند که حدود ۹۸/۵ درصد کل ترکیبات شناخته شده اسانس را تشکیل دادند. بیشترین ترکیبات این اسانس، کاروون (۲۸/۳۵ درصد)، منتول (۱۴/۳۵ درصد)، متیلن (۱۴/۰۵۹ درصد)، و لیمونن (۹/۳۰۳ درصد) بودند. MIC و MBC اسانس این گیاه علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای *اشریشیا کلی* ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. با توجه به ترکیبات ضدباکتریایی اسانس این گیاه می‌توان آن را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در موادغذایی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *نعناع دشتی*، ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضدباکتریایی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*.

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان با توجه به اثرات مضر نگهدارنده‌های غذایی شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگهدارنده های غذایی شیمیایی مصون باشند (Abed et al., 2014; Solano and DeRojas Gante., 2012). اسانس‌ها، مایعات روغنی معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاه نظیر :دانه، ریشه، جوانه، پوست، شاخه، برگ، غنچه و گل به دست می‌آیند و بعضی از اسانس‌های گیاهان به عنوان عوامل ضدمیکروبی طبیعی گزارش شده‌اند (Semeniuc et al., 2017). به طور عمده، ترکیبات فنلی، مسئول خواص ضد میکروبی اسانس‌ها هستند. اسانس‌ها می‌توانند تا بیش از ۶۰ نوع ترکیب داشته باشند و ترکیبات اصلی، ممکن است تا ۸۵ درصد اسانس را تشکیل دهند .نتیجه بعضی از بررسی‌ها نشانگر این موضوع است که اثرات ضد باکتریایی اسانس ها، به صورت کامل نسبت به اثرات تک تک اجزا بیشتر است (Ayfer and Turgay, 2003). گونه ی منتا اسپیکاتا[1] از خانواده نعناعیان و از گیاهان آروماتیک با نام محلی سرسم و نام فارسی نعناع دشتی و پونه سنبله‌ای است. گیاهی چند ساله، علفی، پایا، با ساقه‌های چهار گوش و برگ های متقابل و دندانه دارکه پوشیده از کرک و بدون دمبرگ هستند. گل‌ها به صورت سنبله های باریک و نوک دار، سیستم ریشه ای خزنده است و تکثیر گیاه معمولا از طریق ساقه‌های زیر زمینی یا ریزوم‌ها صورت می‌گیرد. گیاه نعناع در خاک های شنی اسیدی رشد بهتری داشته، شرایط نوری متوسط و رطوبت بالای خاک را ترجیح می‌دهد (Patra and Kumar, 2006). گونه‌ی *منتا اسپیکاتا* از لحاظ ترکیب اسانس تفاوت هایی با دیگر گونه ها دارد که اصلی ترین این تفاوت ها عدم

1 .*Mentha spicata*

وجود منتول و تشکیل شدن ترکیبی به نام کاروون است که در صد بالایی (۷۳٪) از اسانس را شامل می‌شود. در مطالعاتی که روی شناسایی ترکیب‌های مختلف تشکیل دهنده ی عصاره ی گیاه سرسم انجام گرفته است، مشخص شده است که میزان ترکیبات این گونه در دو یا چند منطقه ی مجاور نیز تفاوت هایی وجود دارد (De Feo e al., 1998). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی در سراسر جهان بوده که می تواند انواع مختلف مواد غذایی را آلوده نماید و انتروتوکسین های متعددی را تولید نماید. امروزه *اشریشیا کلی* نیز به عنوان یک پاتوژن روده ای مهم از نظر سلامت عمومی اهمیت بسیار ویژه ای پیدا کرده است. به خصوص سویه *E.cli O157:H7* که می‌تواند در انواع موادغذایی رشد کرده و منجر به کولیت هموراژیک شود (El-Nour and El-Hadedy, 2012). هدف از مطالعه حاضر تعیین ترکیبات شیمیایی و کمترین غلظت مهارکنندگی و باکتری‌کشی اسانس گیاه نعناع دشتی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه اسانس

در مرداد ماه سال ۱۳۹۴ از بازار محلی شهرستان ساری واقع در استان مازندران گیاه نعناع دشتی که در گویش محلی مردم مازندران به آن سرسم گفته می‌شود تهیه گردید و در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان مورد تایید علمی قرار گرفت. برگ‌های این گیاه پس از شستشو، ابتدا در شرایط مناسب در سایه خشک نموده به‌طوری که نور مستقیم خورشید به آن نتابد و از طرفی هوای اتاق هم در جریان باشد. پس از خشک شدن، جهت تهیه اسانس، برگ‌ها با آسیاب برقی‌خرد شدند. جهت استخراج اسانس از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر و به مدت ۳ ساعت استفاده شد. به این منظور۳۰ گرم از نمونه آزمایشگاهی به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب و ۱ گرم کلرید سدیم (افزایش نقطه جوش و خروج کامل اسانس) به بالن ۵۰۰ میلی‌لیتر اضافه گردید. اسانس حاصله توسط سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شده و در ظرف در بسته تیره رنگ، دور از نور در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Kazem Alvandi et al., 2011).

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه گاز کروماتوگراف استفاده شده از نوع Agilent 6890 با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه ی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه‌ی دمایی محصول به این نحو تنظیم شد: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه ی سانتی‌گراد، توقف در این دما ۵ دقیقه و دمای انتهایی آون ۲۴۰ درجه سلسیوس و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی متر در دقیقه استفاده شد. طیف سنج جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود صورت گرفت (Kazem Alvandi et al., 2011; Adams, 2001).

فعالیت ضد باکتریایی

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

باکتری‌های مورد استفاده یعنی *اشریشیا کلی* (PTCC 1338) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی سویه‌های میکروبی از محیط‌های کشت نوترینت آگار و نوترینت براث (ساخت شرکت هایمدیا) استفاده شد. پس از فعال سازی سویه‌های میکروبی از کشت جوان ۲۴ساعته هر یک از باکتری ها ۳-۲ کلنی در سه میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت براث تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید تا حالت کدورت معادل

نیم مک‌فارلند (CFU/ml ۱۰۸× ۱/۵) حاصل شود (Mohammadi et al., 2011; Mahmoudi et al., 2010).

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی(MBC)

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه نعناع دشتی بر اساس کدورت سنجی و با استفاده از روش میکرودایلوشن براث انجام شد. رقت های مختلف اسانس در میکروپلیت ۹۶ چاهکی استریل و با محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف اسانس (محلول ذخیره در حلالDMSO تهیه شد) در مجاورت سوسپانسیون میکروبی معادل CFU/ml ۵×۱۰۵ از هریک از باکتری‌های پاتوژن مورد آزمون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در کنار این لوله ها لوله کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری معادل CFU/ml$۱۰^{۵}$× ۵ در مولر هینتون براث و DMSO) و کنترل منفی (لوله واجد مولر هینتون براث و اسانس بدون باکتری) نیز قرار داده شد. پس از این مدت نتایج به صورت کدورت میکروبی قابل مشاهده و ثبت گردید. آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی(MIC) تعیین شد. به منظور تعیین کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) از هریک از لوله فوق در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت باکتری‌کشی تعیین شد تعیین شد (Franklin et al 2012; Coyle, 2005; Carson et al., 1995).

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس برگ‌های گیاه نعناع دشتی با استفاده از GC/MS در جدول ۱ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده از طیف‌های GC، در این اسانس ۳۳ نوع ترکیب مختلف مورد شناسایی قرار گرفت. بیشترین ترکیبات شیمیایی اسانس برگ‌های گیاه سرسم را کاروون (۲۸/۳۵۰ درصد)، منتول(۱۴/۳۵۰ درصد)، متیلن (۱۴/۰۵۹) و لیمونن (۹/۳۰۳ درصد) تشکیل می‌دهند. نتایج آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس برگ‌های گیاه سرسم علیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* در جدول ۲ آمده است. با توجه به نتایج ثبت شده در این جدول بر اساس ایجاد یا عدم ایجاد کدورت نتایج مربوط به MIC به دست آمد و بر اساس تشکیل یا عدم تشکیل کلنی پس از کشت نتایج MBC به دست آمد. در نتیجه کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس این گیاه علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای *اشریشیا کلی* ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که بیانگر حساسیت بیشتر *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *اشریشیا کلی* نسبت به اسانس گیاه سرسم است.

جدول۱- ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه سرسم

ردیف	نام ترکیب شیمیایی	درصد
۱	Carvone	۲۸/۳۵
۲	Menthol	۱۴/۳۵
۳	Methylene	۱۴/۰۵۹
۴	Limonene	۹/۳۰۳
۵	Geraniol butyrate	۵/۷۰۴
۶	Epi-bicyclosesquiphellandrne	۳/۴۹۱
۷	2-6-octadein	۳/۴۹۱
۸	Alpha-Teripenol	۲/۶۲

۹	Cyclohexane	۲/۰۰۹
۱۰	Cineole	۱/۹۱
۱۱	Agarospirol	۱/۷۶۴
۱۲	Cis-Geraniol	۱/۶۱۹
۱۳	1-Butyladamantane	۱/۳۲۲
۱۴	Caryophulene oxide	۰/۹۱۱
۱۵	Menthofuran	۰/۷۸۶
۱۶	Methyl 5,11,14,17-eicosatetraenoate	۰/۷۸۱
۱۷	Longifolenaldehyde	۰/۷۵۸
۱۸	Alpha.-Caryophyllene	۰/۷۲۴
۱۹	Beta.-Farnesene	۰/۶۹۱
۲۰	Beta-ocimene	۰/۶۶۲
۲۱	Beta-pinene	۰/۶۳۲
۲۲	cis-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	۰/۵۲۷
۲۳	Gamma.-Muurolene.	۰/۵۰۱
۲۴	Beta-trans-osimene	۰/۴۸۴
۲۵	Isocaryophillene	۰/۳۵۷
۲۶	Tetramethyltricyclo-۳،۳،۷،۱۱	۰/۲۵۱
۲۷	Carene	۰/۲۶۱
۲۸	Cyclohexanone, 5-methyl-2	۰/۲۲۴
۲۹	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl- : 2-methylene	۰/۲۱۴
۳۰	Candina-3-4diene	۰/۲۰۱
۳۱	Beta-Terpinene	۰/۱۹۵
۳۲	3-octanol	۰/۱۱۴
۳۳	Alpha-pinene	۰/۱۰۸
	درصد کل ترکیبات شناسایی شده	۹۸/۵

جدول۲_ تعیین کمترین غلظت مهار کنندگی MIC و کمترین غلظت باکتری‌کشی MBC اسانس گیاه سرسم (µg/ml)

غلظت اسانس (µg/ml) باکتری		۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶
استافیلوکوکوس اورئوس	MIC	-	-	-	-	-*	+**	+	+	+
	MBC	-	-	-	-	-***	+****	+	+	+
اشریشیا کلی	MIC	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	MBC	-	-	-	+	+	+	+	+	+

* : عدم کدروت

**: ایجاد کدورت

***: عدم تشکیل کلنی

****: تشکیل کلنی

بحث

مطالعه حاضر فعالیت ضد باکتریایی اسانس نعناع دشتی را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را نشان داد. فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاه نعناع از گیاهان خانواده نعناعیان در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. Zare Bidaki و همکاران به مطالعه فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاه نعناع علیه هشت باکتری پاتوژن مواد غذایی با روش میکرودایلوشن پرداختند. در این مطالعه *باسیلوس سرئوس* حساس ترین باکتری و *کلبسیلا پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم ترین باکتری گزارش شد. کمترین غلظت مهارکنندگی و باکتری‌کشی به ترتیب در محدوده ۰/۲۶ - ۰/۱۰۴ و ۰/۵۲ -۰/۱۵۶ درصد گزاش شد (Zare Bidaki et al., 2014). Rutari و Sharma فعالیت ضدباکتریایی *منتا اسپیکاتا* را علیه باکتری های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* نشان دادند (Raturi and Sharma., 2012). Singh و همکاران نیز کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس این گونه نعناع را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *کلبسیلا پنومونیه* و *اشریشیا کلی* در محدوده ۰/۷ - ۰/۴ درصد گزارش کردند (Singh et al., 2015). Shahbazi در مطالعه‌ای ۱۸ ترکیب در اسانس *منتا اسپیکاتا* با استفاده از کروماتوگرافی گازی شناسایی نمود که کاروون و لیمونن بیشترین ترکیبات این اسانس را تشکیل دادند. فعالیت ضدباکتریایی متوسط این اسانس علیه شش باکتری به اثبات رسید و *لیستریا مونوسایتوژنز* با کمترین غلظت مهارکنندگی ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر حساس‌ترین باکتری نسبت به این اسانس بود. همچنین در این مطالعه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی ها حساسیت بیشتری را نشان دادند (Shahbazi., 2015). در مطالعه‌ای فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های چند گونه از نعناع از جمله *منتا اسپیکاتا* علیه سه ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مورد ارزیابی قرار گرفت. کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس‌های گونه‌های مختلف نعناع در این مطالعه در محدوده ۰/۱۲۵ تا ۰/۲۵ درصد گزارش شد و *منتا اسپیکاتا* در مقایسه با دیگر گونه های نعناع بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان داد (Horvath and Koscova, 2017). در مطالعه حاضر کاروون، منتول، متیلن، و لیمونن غالب ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه سرسم را تشکیل دادند. غالب بودن ترکیبات مونوترپن اکسیژنه همچون کاروون و لیمونن که ماهیت فنلی دارند در مطالعات دیگر نیز به اثبات رسیده است.Hadjiakhoondi و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه ای به بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس *Mentha spicata L.* با استفاده از روش گاز کروماتوگرافی با طیف سنجی جرمی (GC/MS) پرداختند. ۲۸ ترکیب شیمیایی ۹۰/۱۴ درصد ترکیبات را شامل شدند که در این بین کاروون، لینالوول و لیمونن به ترتیب، با ۲۲/۴۰، ۱۱/۲۵ و ۱۰/۸۰ درصد عمده ترین ترکیبات این گیاه خانواده نعناعیان را شامل شدند (Hadjiakhoondi et al., 2000). در دیگر مطاله در کشور پاکستان ۱۹ ترکیب ۹۸ درصد ترکیبات اسانس *Mentha*

spicata L. را شامل شدند که همچون مطالعه حاضر کاروون بیشترین ترکیب شیمیایی موجود در اسانس را تشکیل داد و لیمونن در ردیف بیشترین ترکیبات بود (Hussain et al., 2010) Snoussi. و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعه ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس گیاه *Mentha spicata L.* علیه گونه‌های *ویبریو* نشان دادند که ۳۴ ترکیب شیمیایی، ۹۹ درصد ترکیبات اسانس این گیاه جمع‌آوری شده از کشور تونس را تشکیل می دهند که در این بین کاروون با ۴۰/۸ درصد و لیمونن با ۲۰/۸ درصد غالب‌ترین ترکیبات شیمیایی بودند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (Snoussi et al., 2015). Neyriz Nagadehi و همکاران (۲۰۱۰) نیز ۵۷ ترکیب شیمیایی را با استفاده GC/MS در اسانس گیاه نعناع تهیه شده از شرکت باریج اسانس کاشان شناسایی کردند که کاروون، لیمونن و منتول به ترتیب با ۵۵/۸۷ ، ۲۳/۸۸ و ۳/۳۸ درصد بیشترین ترکیبات شیمیایی این اسانس را شامل شدند (Neyriz Nagadehi et al., 2010). علاوه بر مطالعات ذکر شده، کاروون ترکیب اصلی *Mentha spicata L.* جمع آوری شده از کشور یونان (Adam et al., 1998) و مونتنگرو (Sokovic et al., 2006) را نیز تشکیل داد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. با وجود معرفی کاروون به عنوان عمده‌ترین ترکیب شیمیایی اسانس *M. spicata* در مطالعات متعدد در داخل و خارج کشور، میزان این ترکیب شیمیایی در این مطالعات، متفاوت گزارش شده است. میزان کاروون در اسانس این گیاه در مصر، ۴۶/۴-۶۸/۵۵ درصد(El-Waheb and Mohamed, 2009; Foda et al., 2010)، در کانادا ۵۹-۷۴ درصد (Zheljazkov et al., 2010)، در کلمبیا۶۱/۵۳ درصد (Roldán et al., 2010)، در ترکیه ۷۸/۳۵-۸۲/۲ درصد(Telci et al., 2004; Telci and Sahbaz, 2005)، در چین ۵۵/۴۵-۷۴/۶ درصد (Hua et al., 2011)، در بنگلادش ۷۳/۲ درصد(Chowdhury et al., 2007)، در الجزایر ۵۹/۴ درصد (Boukhebti et al., 2011) و در مراکش ۲۹ درصد (Znini et al., 2011) گزارش شد. تفاوت در نوع (Kofidis et al., 2006) و محتوای ترکیبات شیمیایی اسانس به فاکتورهای متعددی همچون شرایط آب و هوایی و فصلی و موقعیت اقلیمی و جغرافیایی تحت کشت گیاه مرتبط می شود (Hussain et al., 2010; Snoussi et al., 2015). کمترین غلظت مهارکنندگی(MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی(MBC) اسانس برگ‌های سرسم علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای *اشریشا کلی* ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که بیانگر حساسیت بیشتر *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *اشریشیا کلی* نسبت به اسانس گیاه سرسم است.Sivropoulou و همکاران (۱۹۹۵) و Iscan و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که اسانس نعناع تاثیر بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت دارد (Iscan et al., 2002; Sivropoulou et al., 1996) . Delaquis و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که باکتری های گرم مثبت در برابر اسانس‌های شوید، گشنیز و اکالیپتوس نسبت به باکتر یهای گرم منفی بسیار حساس ترند (Delaquis et al., 2002). اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌ها نشان از حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی است که در مطالعه حاضر نیز به چشم می خورد. علت حساسیت کمتر گرم منفی ها شاید به علت وجود غشاء خارجی در باکتری‌های گرم منفی است که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپوپلی یا ساکارید می شوند (Deans et al., 1997; Burt, 2004). اثر ضدباکتریایی اسانس این گیاه ممکن است به کاروون، لیمونن و منتول موجود در ترکیبات شیمیایی این گیاه بستگی داشتهباشد. Aggarwal و همکاران نیز فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی انانتیومرهای کاروون و لیمونن جدا شده از نعناع را مورد تایید قرار دادند (Aggarwal et al., 2002). اثر ضد باکتریایی لیمونن، منتول، پولگون و منتون بر باکتریهایی چون *سالمونلا* و *لیستریا* مورد بررسی قرار گرفته است وگزارش شده که پولگون، دارای بیشترین اثر روی سالمونلا است (Flamini et al., 1999).به طور کلی ترکیبات فعال ضد میکروبی اسانس ها نظیر کارون، تیمول و کارواکرول ماهیت فنلی دارند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که در مورد بسیاری از گیاهان تیره‌ی نعناع از جمله گیاه سرسم کاروون و منتول مهم‌ترین اجزای موثر در

فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها می‌باشند. همچنین مشخص شده با افزایش درصد این مواد در اسانس، میزان فعالیت ضدمیکروبی افزایش می‌یابد (Helander et al., 1998; Gallucci et al., 2010). بسیاری از محققین تاکید کرده اند که خاصیت ضدباکتریایی اجزاء اصلی اسانس‌ها به خاصیت هیدروفوبیک آنها و دیواره غشاء پلاسمایی میکروب بستگی دارد. افزایش مقدار برخی یون‌های ویژه بر روی و یا داخل غشاء پلاسمایی تاثیر وسیعی بر روی نیروی محرکه پروتون ها، میزان ATP درون سلولی و فعالیت کلی سلول‌های میکروبی (شامل کنترل فشار ورم سلول‌های زنده، انتقال مواد حل شونده و تنظیم متابولیسم) دارد. نتیجه اینکه اسانس‌ها مکانیزم عمل یکسانی نداشته و ممکن است از طرق مختلف باعث جلوگیری از رشد باکتری ها شوند. در اغلب تحقیقاتی که بر روی مکانیزم عمل ترکیبات فنولیک انجام شده است اکثراً صحبت از تاثیر اسانس‌ها بر غشاء سلولی می‌باشد. در حقیقت ترکیبات فنولی نه تنها به غشاء سیتوپلاسمی حمله می‌کنند، حتی به‌موجب آن باعث تخریب قابلیت نفوذپذیری غشاء شده و نیز باعث آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلول(مثل ریبوز و گلوتامات سدیم و ...) می شوند و نیز می توانند تخریب عملکرد در زمینه انتقال الکترون، جذب مواد مغذی، سنتز نوکلئیک اسید و همچنین فعالیت آنزیمATPase را به همراه داشته باشند (Kazem Alvandi et al., 2011). در مورد نحوه عمل اسانس‌ها در مورد مرگ باکتری‌ها، چنین اظهار نظر شده است که متابولیت‌های فنلی موجود در گیاهانی چون نعناع، توانایی این را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و دیگر بیومولکول‌های غشای سلولی و تخریب آن شوند و به این ترتیب، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد التهابی خود را اعمال کنند (Strycharz and Shetty, 2002).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر حاکی از فعالیت ضد باکتریایی اسانس برگ‌های گیاه سرسم می‌باشد و این فعالیت را می‌توان به وجود ترکیبات شیمیایی مونوترپن همچون کاروون، منتول، متیلن، و لیمونن که ماهیت فنلی دارند نسبت داد. لذا استفاده از این اسانس در موادغذایی بعنوان یک ترکیب ضد باکتریایی، جایگزینی آن را به جای مواد نگهدارنده شیمیایی مطرح می‌سازد که البته تحقیقات بیشتر در این خصوص ضرورت دارد.

منابع

1. Abed, N.E., Kaabi, B., Smaali, M.I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., MarzoukiBen, M.N. and Hadj Ahmed, S. 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. Evid Based Complement Alternat Med, 2014: 1-11.
2. Adam, K., Sivropoulol, A., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare subsp. hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. J Agric Food Chem, 46(5): 1739–1745.
3. Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, 469.
4. Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S., Ahmad, A., Santha Kumar, T.R., Gupta, V.K. and Kumar, S., 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. Flavour Frag. J, 17(1): 59-63.
5. Ayfer, D. and Turgay, O., 2003. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turkish J Biol., 27: 157-62.
6. Boukhebti, H., Chaker, A.N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H. and Harzallah, D., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium L.* and *Mentha spicata L.* essential oils. Der Pharmacia Lettre, 3(4): 267–275.
7. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. Int J Food Microbiol, 94(3): 223-253.

8. Carson, C.F., Hammer, K.A. and Riley, T.V., 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Microbios, 82(332): 181-185.

9. Chowdhury, J.U., Nandi, N.C., Uddin, M. and Rahman, M., 2007. Chemical constituents of essential oils from two types of spearmint (*Mentha spicata L.* and *M. cardiaca L.*) introduced in Bangladesh. Bangladesh J. Sci. Ind. Res., 42(1): 79–82.

10. Coyle, M.B., 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing, American Society for Microbiology, 53-62.

11. Deans, S.G. and Ritchi, G., 1997. Antibacterial properties of plant essential oils. Int J Food Microbiol, 5: 165-180.

12. De Feo, V., Ricciardi, A.I., Biscardi, D. and Senatore, F., 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillate* (Griseb) Ep1 (*Lamiaceae*). J. Essent. Oil Res, 10(1): 61-5.

13. Delaquis, D.J., Stanich, K., Girard, M. and Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of *dill, cilantro, coriander* and *eucalyptus* essential oils. Int J Food Microbiol, 74(1-2): 101-109.

14. El-Nour, S.A and El-Hadedy, D. 2012. Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods. Genet Eng Biotechnol J, 10 (1):129-135.

15. El-Waheb, A. and Mohamed, A. 2009. Evaluation of spearmint (*Mentha spicata L.*) productivity grown in different locations under upper Egypt conditions. Res. j. agric. biol. sci, 5(3): 250–254.

16. Flamini, G., Cioni, P.L., Puleio, R., Morelli, I. and Panizzi, L., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its *constituent pulegone* against bacteria and fungi. Phytother Res, 13(4): 349-51.

17. Foda, M.I., El-Sayed, M.A., Hassan, A.A., Rasmy, N.M. and El-Moghazy, M.M., 2010. Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. J Am Sci, 6(5): 272–279.

18. Franklin, R., Cockerill, I.I.I., Matthew, A., Wikler, M.B.A., FIDSA Jeff Alder,Michael, N. and et al., 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, M07-A9 32(2).

19. Gallucci, N., Oliva, M., Carezzano, E., Zygadlo, J.and Demo, M., 2010. Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non–producing staphylococci. Mol. Med. Chem, 21: 132–136.

20. Hadjiakhoondi, A., Aghel, N., Zamanzadeh-Nadgar, N. and Vatandoost, H., 2000. Chemical and biological study of *Mentha spicata L*. essential oil from Iran. DARU J. Pharm. Sci., 8(1-2): 19-21.

21. Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem, 46(9): 3590–3595.

22. Horváth, P. and Koscova, J. 2017. *In vitro* Antibacterial Activity of *Mentha* Essential Oils Against *Staphylococcus aureus.* Folia Vet, 61 (3): 71-77.

23. Hua, C.X., Wang, G.R. and Lei, Y., 2011. Evaluation of essential oil composition and DNA diversity of mint resources from China. Afr J Biotechnol, 10(74): 16740–16745.

24. Hussain, A.I., Anwar, F. and Shahid, M. 2010. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata L.*) From Pakistan. J. Essent. Oil Res, 22(1): 78-84.

25. Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcouglu, M., Husnu Canbaser, K. and Demirci F., 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. J. Agric. Food Chem, 50(14): 3943-3946.

26. Kazem Alvandi, R., Sharifan, A. and Aghazadeh Meshghi, M., 2011. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. J. Comp. Pathol., 7(4): 355-64.

27. Kofidis, G., Bosabalidis, A. and Kokkini, S., 2006. Seasonal variations of essential oils in a linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. J. Essent. Oil Res, 16: 469-472.

28. Mahmoudi, R., Ehsani, A., Tajik, H., Akhonzade Basti, A. and Khosrowshahi, A., 2010. Antimicrobial effects of *Mentha Longifolia L*. Essential oil and *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus aureus* in Iranian White Cheese. J Food Res, 1, 3 (20): 147-161.

29. Mohammadi, K., Karim, G., Hanifian, S.H., Tarinejad, A.R. and Gasemnezhad, R., 2011. Antimicrobial Effect of *Zataria Multiflora* Boiss Essential Oil on *Escherichia Coli O157:H7* During Manufacture and Ripening of White Brined Cheese. Journal of Food Hygiene,1, 2(2): 69-78.

30. Neyriz Nagadehi, M., Razavi Rohani, S.M., Karim, G., Razavilar, V., Zeynali, A. and Delshad, R., 2010. The Effect of Monolaurin in Combination with *Mentha pulegium L*. and *Mentha spicata L*. Essential Oils on *Bacillus cereus* and *E. coli O157:H7*: In vitro study. Veterinary Journal Tabriz, 3, 4(12): 657-666.

31. Patra, N.K. and Kumar, B., 2006. Spearmint in: Hand book of herbs and apices. cambridge, England, wood head publishing limited, 3: 502-517.

32. Raturi, P. and Sharma, A. 2012. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Extracted from *Mentha Spicata L*. Indian journal of engineering & materials sciences, 1(1): 22-26.

33. Roldán, L.P., Díaz, G.J. and Duringer, J.M., 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 23: 451–461.

34. Roler, S., 1995. The quest for natural Antimicrobials as novel means of food preserration: status reports on a european research project. Int Biodeterior Biodegradation, 36(3-4): 333-345.

35. Semeniuc, C.A., Pop, C.R. and Rotar, M. 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. J Food Drug Anal, 25 (2):403-408.

36. Shahbazi, Y. 2015. Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of Mentha spicata Essential Oil against Common Food-Borne Pathogenic Bacteria. J Pathog, 2015: 1-5.

37. Singh, R., Shushni, A.N.M. and Belkheir, A. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita L.* Arab. J. Chem., 8 (3):322-328.

38. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., Papaniko laou, E. and Nikolaou, C., 1996. Antimicrobial and cytotixic activities of *Origanum* essential oil concentration. J. Agric. Food Chem, 44(5): l202-1205.

39. Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. and De Feo, V., 2015. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of Vibrio spp. Strains. Molecules, 20(8): 14402-14424.

40. Sokovic, M. and Griensven, L.J.L.D.V., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, Agaricul bisporus. Eur. J. Plant Pathol., 116: 211–224.

41. Solano, A.C.V. and De Rojas Gante, C. 2012. Two different processes to obtain antimicrobial packaging containing natural oils. Food Bioprocess Technol, 5 (2012): 2522-2528.

42. Strycharz, S.and Shetty, K., 2002. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of *Mentha pulegium* in response to polymeric dye R-478 and *Agrobacterium rhizogenes*. Process Biochem, 37(8): 805- 12.

43. Telci, I. and Sahbaz, N., 2005. Variations in yield, essential oil and carvone contents in clones selected from Carvone-scented landraces of Turkish *Mentha* species. Journal of agronomy, 4(2): 96–102.

44. Telci, I., Sahbaz, N., Yilmaz, G. and Tugay, M.E., 2004. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata L.*) originating in Turkey. Econ. Bot, 58: 721–728.

45. Zare Bidaki, M., Arab, M., Khazaei, M. and Afkar, E. 2014. Anti-bacterial effect of *Mentha spicata L.* essence on eight standard species of gastrointestinal pathogens. Journal of Birjand University of Medical Sciences,21 (3): 274-282.

46. Zheljazkov, V.D., Cantrell, C.L. and Astatkies, T., 2010. Yield and composition of oil from Japanese cornmint fresh and dry material harvested successively. Agron. J., 102(6): 1652–1656.

47. 47. Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Costa, J. and Al-Dyab, S.S., 2011. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. Int J Electrochem Sci, 6(2011): 691–704.

Determination of chemical composition and minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Mentha spicata L.* essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Mokhayeri K[1], Koohsari H[2*],Seyyed Alangi SZ[3]

1. Graduated student, Department of Food Science and technology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

2. Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

3. Department of Chemistry, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

[*]**Corresponding author**: *hadikoohsari@yahoo.com*

Received: 10 May 2017 Accepted: 29 November 2017

Abstract

Mentha spicata L. (Peppermint) is a widely used medicinal herb that also as a commonly herb spice has used in the food industry.This study carried out to evaluating of chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha spicata L.* (Peppermint) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.Essential oil of the herb leafs was extracted by Clevenger apparatus. Chemical composition of essential oil was identified with a Gas chromatography/mass spectrometry system and then Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of this essential oil were determined using micro-dilution broth method in microplate 96 pits. A total of 33 chemical constituents were identified which contained 98.5% the total of essential oil compounds. The most important components of this essential oil were: carvone (%28.35), menthol (%14.35), methylene (%14.059) and limonene (%9.303). MIC and MBC of essential oil of this herb against the *S. aureus* 25 and 25 µg/ml and against the *E.coli* was 50 and 100 µg/ml respectively. Due to antibacterial compounds of essential oil of this plant, it can be used as a natural preservative in food.

Keywords:*Mentha spicata*, Chemical composition, Antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.